



**REPUBLIK INDONESIA
KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA**

SERTIFIKAT PATEN

Menteri Hukum dan Hak Asasi Manusia atas nama Negara Republik Indonesia berdasarkan Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten, memberikan hak atas Paten kepada:

Nama dan Alamat Pemegang Paten : UNIVERSITAS SURABAYA
Jln Ngagel Jaya Selatan 169, Surabaya

Untuk Invensi dengan Judul : PROSES IMOBILISASI ENZIM GLUKOSA OKSIDASE
MENGUNAKAN BENTONIT ALAM TERAKTIFKAN DENGAN
TETRAMETIL AMONIUM HIDROKSIDA

Inventor : Restu Kartiko Widi, S.Si, M.Si, Ph.D
Arief Budhyantoro, S.Si, M.Si
Ruth Chrisnasari, S.TP, M.P

Tanggal Penerimaan : 08 Februari 2013

Nomor Paten : IDP000063281

Tanggal Pemberian : 08 Oktober 2019

Perlindungan Paten untuk invensi tersebut diberikan untuk selama 20 tahun terhitung sejak Tanggal Penerimaan (Pasal 22 Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten).

Sertifikat Paten ini dilampiri dengan deskripsi, klaim, abstrak dan gambar (jika ada) dari invensi yang tidak terpisahkan dari sertifikat ini.



a.n. MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA
DIREKTUR JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL

Dr. Freddy Harris, S.H., LL.M., ACCS.
NIP. 196611181994031001



(12) PATEN INDONESIA

(11) IDP000063281 B

(13) DIREKTORAT JENDERAL
KEKAYAAN INTELEKTUAL

(45) 08 Oktober 2019

(51) Klasifikasi IPC⁸ : C 12N 11/14

(21) No. Permohonan Paten : P00201300089

(22) Tanggal Penerimaan: 08 Februari 2013

(30) Data Prioritas :
(31) Nomor (32) Tanggal (33) Negara

(3) Tanggal Pengumuman: 28 Agustus 2014

(4) Dokumen Pembanding:
CN1690200(A)
GB2122621 B
US4141857 A

(71) Nama dan Alamat yang Mengajukan Permohonan Paten :
UNIVERSITAS SURABAYA
Jln Ngagel Jaya Selatan 169, Surabaya

(72) Nama Inventor :
Restu Kartiko Widi, S.Si, M.Si, Ph.D, ID
Arief Budhyantoro, S.Si, M.Si, ID
Ruth Chrisnasari, S.TP, M.P, ID

(74) Nama dan Alamat Konsultan Paten :

Pemeriksa Paten : Drs. Syafrizal

Jumlah Klaim : 3

Judul Invensi : PROSES IMOBILISASI ENZIM GLUKOSA OKSIDASE MENGGUNAKAN BENTONIT ALAM TERAKTIFKAN DENGAN TETRAMETIL AMONIUM HIDROKSIDA

Abstrak :

Manfaatan enzim Glukosa Oksidase (GOD) terus berkembang baik dalam bidang industri maupun dalam bidang medis, biosensor, dan sebagainya. Secara teknis sangat sulit untuk memisahkan enzim dan produk dan mendapatkan kembali enzim yang aktif diakhir reaksi, tanpa dilakukan imobilisasi enzim. Salah satu bahan alam yang dapat digunakan untuk imobilisasi adalah bentonit. Untuk meningkatkan kemampuan bentonit dalam mengimobilisasi enzim, dilakukan modifikasi bentonit berupa penambahan surfaktan Tetrametil Ammonium hidroksida (TMAOH).

Bahan surfaktan pada bentonit menggunakan TMAOH dilakukan dengan memanaskan campuran bentonit dan TMAOH pada suhu selama 5 jam. Penambahan TMAOH dilakukan dengan perbandingan bentonit alam : larutan Tetrametil Ammonium Hidroksida adalah 1 - 5 gram : 100 mL dan konsentrasi Tetrametil Ammonium Hidroksida (TMAOH) adalah 0,75% - 5,0% (v/v). Imobilisasi GOD dilakukan dengan cara mencampurkan larutan enzim dengan bentonit teraktifkan dengan perbandingan bentonit teraktifkan : enzim GOD adalah 5gr : 250 mL. Konsentrasi enzim GOD yang dipergunakan sebesar 5 IU - 100 IU.

Dari hasil penelitian ini, enzim GOD yang terimobilisasi pada bentonit teraktifkan mencapai 88,5%. Enzim GOD terimobilisasi yang dihasilkan ini sehingga dapat digunakan sebanyak minimal 10 kali dengan penurunan aktivitas hanya sebesar 50%.



Deskripsi

PROSES IMOBILISASI ENZIM GLUKOSA OKSIDASE MENGGUNAKAN BENTONIT ALAM TERAKTIFKAN DENGAN TETRAMETIL AMONIUM HIDROKSIDA

Bidang Teknik Invensi

Invensi ini berkaitan dengan proses pembuatan matriks enzim glukosa oksidase terimobilisasi menggunakan bentonit alam yang teraktifasi dengan tetrametil amonium hidroksida (TMAOH).

Latar Belakang Invensi

Enzim adalah suatu katalis biologis, yaitu suatu senyawa protein yang dapat mengkatalisis reaksi biologis dalam tubuh manusia, hewan maupun tumbuhan. Salah satu enzim yang sering menjadi perhatian adalah enzim glukosa oksidase (GOD) (EC 1.1.3.4) berkenaan dengan pemanfaatannya yang besar dalam reagen pendiagnosa penyakit, biosensor, zat aditif makanan, reagen analitik dan sebagainya. Enzim GOD adalah suatu enzim oksido-reduktase yang mengkatalisis oksidasi glukosa menjadi hidrogen peroksida dan D-glucono- δ -lactone.

Masalah yang paling sering muncul pada aplikasi reaksi enzimatik yang umumnya menggunakan cara *batch* yaitu mereaksikan substrat dengan enzim yang sudah dilarutkan dalam pelarut, adalah enzim hanya digunakan sekali pakai. Selain itu interaksi secara langsung antara enzim dengan pelarut (terutama pelarut organik) dapat mempengaruhi konformasi aktifitas enzim sehingga dapat menurunkan aktifitasnya. Imobilisasi enzim merupakan salah satu metode yang paling menjanjikan untuk mencegah penurunan aktifitas enzim.

Imobilisasi enzim didefinisikan sebagai enzim-enzim yang secara fisik berada dalam suatu tempat/lokasi tertentu sehingga tidak bebas bergerak, namun tidak kehilangan aktifitas katalisisnya dan dapat digunakan secara berulang (Chibata, 1978). Pemanfaatan imobilisasi enzim memberikan peluang untuk meningkatkan stabilitas enzim. Imobilisasi mencegah interaksi protein-protein yang dapat menyebabkan terjadinya agregasi molekul protein sehingga pada

akhirnya menyebabkan timbulnya deaktivasi enzim (Vasileva and Godjevargova, 2005). Dengan karakteristiknya yang masih seperti enzim asalnya memberikan keunggulan tersendiri terhadap proses imobilisasi tersebut, yaitu enzim dapat digunakan dalam proses katalisis secara berulang dan berkesinambungan.

5 Metode imobilisasi enzim dapat digunakan sebagai salah satu cara untuk mengatasi masalah ini. Imobilisasi enzim adalah penempatan enzim secara fisik di dalam suatu daerah/ruang tertentu, sehingga dapat menahan aktifitas katalitiknyanya serta dapat digunakan secara berulang-ulang. Setelah proses selesai, enzim dapat dipisahkan dari produk dan diperoleh kembali, sehingga enzim
10 terimobilisasi tersebut dapat digunakan untuk tahap berikutnya. Selain itu, imobilisasi bermanfaat dalam pencegahan interaksi protein-protein yang dapat menyebabkan terjadinya agregasi molekul protein sehingga pada akhirnya menyebabkan timbulnya deaktivasi enzim (Vasileva and Godjevargova, 2005).

Salah satu bahan alam yang dapat digunakan untuk imobilisasi adalah bentonit. Bentonit memiliki karakteristik yang sesuai dengan material imobilisator dan terdapat melimpah di Indonesia. Salah satu metode imobilisasi enzim GOD pada bentonit adalah metode adsorpsi, yaitu penyerapan enzim untuk masuk ke pori-pori bentonit. Dengan metode adsorpsi, diharapkan konformasi enzim tidak berubah sehingga enzim dalam bentuk yang tetap aktif karena tidak terjadi ikatan
20 kimiawi yang kuat antara bentonit dan enzim yang dapat mengubah struktur enzim. Untuk meningkatkan kemampuan bentonit dalam mengimobilisasi enzim, dilakukan modifikasi bentonit berupa interkalasi menggunakan kation organik (surfaktan). Interkalasi adalah penyisipan suatu spesies pada ruang antar lapis dari padatan dengan tetap mempertahankan struktur berlapisnya. Metode ini akan
25 memperbesar pori material, karena interkalan akan mendorong lapisan atau membuka antar lapisan untuk mengembang (Schubert, 2002). Proses ini mampu memperbesar ukuran pori bentonit sampai ukuran meso (20 – 60 Å atau lebih), sehingga diharapkan molekul enzim dapat terperangkap dan tidak mudah lepas dari bentonit tanpa kehilangan aktifitasnya. Salah satu molekul surfaktan yang
30 dapat digunakan adalah TMAOH (TetraMetil Amonium Hidroksida). TMAOH dipilih karena memiliki ukuran molekul yang cukup besar sehingga diharapkan mampu menjaga jarak antar lapisan pada bentonit.

Invensi sebelumnya yang dikemukakan oleh Garwood et al (1983) adalah imobilisasi GOD pada lempung (*montmorillonite clay*) termodifikasi hexadecyltrimethylammonium melalui interaksi hidrofobik menghasilkan persen imobilisasi 4,7%, sedangkan imobilisasi GOD pada Na⁺-montmorillonite dengan interkalasi ionik menghasilkan persen imobilisasi 79%. Namun imobilisasi ini sangat sensitif terhadap perubahan pH.

Sarkar et al (1989) juga melakukan invensi berupa imobilisasi GOD pada tanah yang diaktifasi oleh 3-aminopropyltriethoxysilane dan kehilangan aktifitasnya sebesar 25% setelah 15 hari.

Invensi yang menggunakan bentonit termodifikasi surfaktan dikemukakan oleh Paul James (EP 1907099 A1, 2008) yang memanfaatkan *cetyltrimethyl bromide (CTAB)* dan *cetyltrimethyl ammonium tosylate (TTAB)* sebagai surfaktannya. Penambahan surfaktan pada bentonit ini dapat memperlebar jarak antar lapisan bentonit sehingga memperbesar ukuran pori dan mengurangi sifat hidrofilisitasnya. Invensi tersebut diaplikasikan sebagai bahan filter kontaminan toksin dalam gas.

Invensi ini menyediakan enzim GOD yang terimobil pada bentonit alam asal Pacitan, Jawa Timur yang telah diaktifkan dengan menambahkan tetrametil amonium hidroksida (TMAOH), yang menghasilkan produk berupa enzim GOD terimobil dengan persen imobilisasi sangat tinggi mencapai 88,5%, bersifat stabil terhadap perubahan suhu dan pH, memiliki aktifitas cukup tinggi, serta memiliki siklus pemakaian yang sangat tinggi hingga lebih dari 10 siklus.

Uraian Singkat Invensi

Invensi ini menyediakan proses untuk menghasilkan enzim GOD terimobil yang memiliki kestabilan dan siklus pemakaian yang sangat baik, menggunakan bentonit alam asal Pacitan, Jawa Timur yang diaktifkan/dimodifikasi terlebih dahulu.

Suatu proses pembuatan matriks enzim glukosa oksidase (GOD) terimobilisasi, meliputi langkah-langkah berikut:

Mengaktifasi bentonit alam dengan menambahkan Tetrametil Ammonium Hidroksida (TMAOH) dengan konsentrasi 0,75% - 5,0% (v/v), kemudian mencampurkan enzim GOD pada bentonit yang telah teraktifasi tersebut dengan

perbandingan 250 ml GOD : 5 gr bentonit teraktifkan. Selanjutnya campuran diaduk menggunakan alat pengaduk putar otomatis selama 24 jam pada suhu kamar, lalu mensentrifus larutan untuk memisahkan matriks enzim GOD terimobil. Proses pembuatan matriks enzim terimobil ini menggunakan konsentrasi TMAOH yang lebih disukai adalah 5% (v/v), sedangkan untuk ukuran bentonit yang telah teraktifasi TMAOH adalah 140 mesh.

Uraian Lengkap Invensi

Bahan yang dipergunakan sebagai material pengimobil adalah bentonit alam dari Pacitan, Jawa Timur. Bentonit alam yang masih menyerupai batu, dihancurkan terlebih dahulu hingga menyerupai serbuk. Serbuk bentonit selanjutnya diayak agar diperoleh ukuran partikel yang seragam sekitar 140 mesh. Bentonit alam ini masih memiliki sifat mengembang yang besar dengan adanya air dan segera menyusut kembali jika air menghilang. Hal ini dapat mengurangi kemampuan bentonit dalam mengimobilisasi enzim. Oleh karena itu bentonit perlu diaktifkan salah satunya dengan penambahan surfaktan (interkalasi) berupa Tetrametil Ammonium Hidroksida (TMAOH). Tujuan dari aktivasi dengan penambahan surfaktan adalah untuk menukar kation Ca^{2+} yang ada dalam Ca-Bentonit dengan ion TMA^+ dari TMAOH. Ion TMA^+ akan masuk ke antara lapisan-lapisan bentonit menghasilkan pilar-pilar yang memperbesar jarak antara lapisan bentonit sehingga terdapat pori dimana enzim GOD dapat masuk dan terperangkap dalamnya. Ca-bentonit memiliki daya tukar ion yang cukup besar sehingga ion TMA^+ akan mudah masuk ke ruang antar lapisan, untuk bertukar dengan kation-kation yang terdapat di ruang antar lapisan tersebut. Interkalasi dilakukan dengan mencampur larutan TMAOH dan suspensi bentonit, dimana rasio bentonit : larutan TMAOH = 5gr : 100 ml, sedangkan variasi konsentrasi TMAOH yang digunakan adalah antara 0,75% sampai 5% (v/v). TMAOH dimasukkan ke dalam labu alas bulat dan dipanaskan sampai suhu 75°C disertai pengadukan. Setelah suhu mencapai 75°C , dilakukan penambahan bentonit secara perlahan-lahan dan dijaga agar suhunya tidak turun drastis. Selanjutnya, dilakukan refluks selama 5 jam. Hasil interkalasi dibilas dengan aquades hingga pH netral, lalu disaring dengan corong buchner dan dikeringkan dengan oven pada suhu 100°C semalaman. Selanjutnya, bentonit termodifikasi yang telah

kering tersebut diayak dengan ayakan 140 mesh untuk menyeragamkan kondisi bentonit sehingga hasil imobilisasi lebih valid. Ukuran 140 mesh dipilih karena ukuran yang bentonit yang terlalu besar akan memperkecil luas permukaan sehingga dapat menurunkan persentase imobilisasi, sedangkan ukuran yang
 5 terlalu kecil akan menyebabkan bentonit membentuk suspensi dalam larutan sehingga dapat menyulitkan pemisahan dari campuran reaksinya.

Imobilisasi enzim glukosa oksidase (GOD) dilakukan dengan cara adsorpsi fisik pada bentonit yang telah diaktifkan dengan surfaktan TMAOH. Adsorpsi yang terjadi pada permukaan zat padat disebabkan oleh adanya gaya tarik atom atau
 10 molekul pada permukaan zat padat. Proses imobilisasi enzim GOD dilakukan dengan mencampurkan 0,2 gram bentonit termodifikasi dengan 4 ml buffer fosfat pH 7 0,1 M dan 10 ml larutan enzim GOD 100 IU. Campuran bentonit, buffer, dan enzim diaduk menggunakan alat pengaduk putar otomatis selama 24 jam pada suhu 20°C, dan dilakukan pemisahan menggunakan alat sentrifugasi pada suhu
 15 ruang selama 10 menit pada 4.000 rpm. Supernatan yang mengandung sisa enzim GOD yang tidak terimobilisasi diuji kadar proteinnya dengan metode Hartree Lowry. Pellet tersebut disuspensikan dalam 4 ml buffer fosfat pH 7, dan diambil 1 ml untuk dicuci dengan buffer pH 7 beberapa kali sehingga hasil cucian tidak menunjukkan adanya protein saat diuji dengan metode Hartree Lowry.
 20 Pemisahan enzim terimobilisasi bentonit dengan buffer cucian dilakukan dengan sentrifuge pada kecepatan 11.000 rpm selama 15 menit.

Hasil imobilisasi enzim GOD pada bentonit teraktifkan tersebut selanjutnya diuji untuk mengetahui persentase imobilisasi, kestabilan terhadap suhu dan pH, harga K_m dan V_{max} , serta siklus pemakaiannya seperti tertera pada tabel berikut:

Tabel 1. Pengaruh konsentrasi TMAOH pada interkalasi bentonit terhadap %imobilisasi enzim GOD

konsentrasi TMAOH pada interkalasi bentonit	% GOD terimobil
0%	27,1
0,75%	77,7
1,60%	79,5
2,45%	75,9
3,30%	72,3
4,15%	75,1
5%	88,5

Tabel 2. Pengaruh imobilisasi enzim GOD pada bentonit teraktifkan terhadap kondisi reaksi enzimatis GOD

Parameter	Enzim GOD	
	terimobil	bebas
Suhu terbaik (°C)	30 - 40	30 - 40
pH terbaik	5,5 - 7	5,5 - 7
Siklus	> 10 kali, dengan penurunan aktifitas sampai siklus 10 adalah 50%	Tidak dilakukan
Aktifitas Spesifik (mmol/L.min.mg)	0,07	0,12
Km (mg/L)	4438,069	4184,025
Vmax (mg/L.min)	0,169768	0,212549

Hingga sepuluh kali siklus pemakaian penurunan aktifitas yang ditunjukkan baru sebesar 50%, padahal dalam pemakaian normal siklus ditentukan hingga penurunan aktifitas sebesar 100% atau tidak ditemukan aktifitas enzim lagi. Dengan demikian imobilisasi enzim GOD pada bentonit teraktifkan ini menghasilkan matriks yang aktif dan stabil.

10

15

20

25

Klaim

1. Suatu proses pembuatan matriks enzim glukosa oksidase terimobilisasi, meliputi langkah-langkah berikut:
 - a. Mengaktifasi bentonit alam dengan menambahkan Tetrametil Ammonium Hidroksida dengan konsentrasi 0,75% - 5,0% (v/v);
 - b. Mencampurkan enzim glukosa oksidase pada bentonit yang telah teraktifasi tersebut di atas dengan perbandingan 250 ml glukosa oksidase : 5 gr bentonit teraktifkan;
 - c. Mengaduk larutan campuran (b) menggunakan alat pengaduk putar otomatis selama 24 jam pada suhu kamar, kemudian mensentrifus larutan untuk memisahkan matriks enzim glukosa oksidase terimobil.
2. Proses menurut klaim 1, dimana konsentrasi Tetrametil Ammonium Hidroksida yang digunakan adalah 5% (v/v).
3. Proses menurut klaim 1, dimana ukuran bentonit yang telah teraktifasi Tetrametil Ammonium Hidroksida adalah 140 mesh.

Abstrak

PROSES IMOBILISASI ENZIM GLUKOSA OKSIDASE MENGGUNAKAN BENTONIT ALAM TERAKTIFKAN DENGAN TETRAMETIL AMONIUM HIDROKSIDA

Pemanfaatan enzim Glukosa Oksidase (GOD) terus berkembang baik dalam bidang industri maupun dalam bidang medis, biosensor, dan sebagainya. Secara teknis sangat sulit untuk memisahkan enzim dan produk dan mendapatkan kembali enzim yang aktif diakhir reaksi, sehingga dilakukan imobilisasi enzim. Salah satu bahan alam yang dapat digunakan untuk imobilisasi adalah bentonit. Untuk meningkatkan kemampuan bentonit dalam mengimobilisasi enzim, dilakukan modifikasi bentonit berupa penambahan surfaktan Tetrametil Ammonium Hidroksida (TMAOH).

Penambahan surfaktan pada bentonit menggunakan TMAOH dilakukan dengan memanaskan campuran bentonit dan TMAOH pada suhu 75°C selama 5 jam. Penambahan TMAOH dilakukan dengan perbandingan bentonit alam : larutan Tetrametil Ammonium Hidroksida (TMAOH) adalah 1 - 5 gram : 100 mL dan konsentrasi Tetrametil Ammonium Hidroksida (TMAOH) adalah 0,75% - 5,0% (v/v). Imobilisasi enzim GOD dilakukan dengan cara mencampurkan larutan enzim dengan bentonit teraktifkan dengan perbandingan bentonit teraktifkan : larutan enzim GOD adalah 5gr : 250 mL. Konsentrasi enzim GOD yang dipergunakan sebesar 5 IU - 100 IU.

Sesuai invensi ini, enzim GOD yang terimobilisasi pada bentonit teraktifkan mencapai 88,5%. Enzim GOD terimobilisasi yang dihasilkan ini cukup stabil sehingga dapat digunakan sebanyak minimal 10 kali dengan penurunan aktivitas hanya sebesar 50%.